

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月7日現在

機関番号：32661
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790104
 研究課題名(和文) 核内受容体CARを介した生体外異物による活性化機構及びエネルギー代謝調節攪乱
 研究課題名(英文) Activation mechanism of nuclear receptor CAR by xenobiotics and CAR-mediated disruption of energy metabolism
 研究代表者
 菅野 裕一郎 (KANNO YUICHIRO)
 東邦大学・薬学部・講師
 研究者番号：40453849

研究成果の概要(和文)：

異物受容体として知られるConstitutive Androstane Receptor(CAR)の生体外異物に対する薬物代謝酵素の誘導などを介した防御機構において重要な役割を担っている。しかしながら近年、CARがエネルギー代謝に関与していることが明らかとなっている。本研究より、CARの新たな結合タンパク質として、AMPK β 、DP97、PRMT5、Hsp60を見出した。DP97及びPRMT5はCARの標的遺伝子選択的なコアクチベーターとして作用することを明らかとした。また、LXRのリガンドであるT0901317がCARの活性を調節するインバースアゴニストとして作用することを明らかとした。これらの成果により、異物受容体として知られる核内受容体CARの新たな機能及び活性調節機構の新たな可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：

The constitutive androstane receptor (CAR) plays an important role of a defence mechanism against the toxicity of xenobiotics. In this study, we identified novel CAR binding proteins, which were AMPK β , DP97, PRMT5 and Hsp60. We showed DP97 and PRMT5 act as a gene (or promoter)-selective co-activators for CAR. Furthermore, we showed the basal transcriptional activity of unliganded CAR was shown to be repressed by the potent liver X receptor (LXR) agonist, T0901317.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：転写因子・分子生物学・代謝調節・核内受容体・環境衛生系薬学・環境毒性学

1. 研究開始当初の背景

生体には医薬品や環境汚染物質などの生体外異物に対する防御機構が備わっている。脂溶性の生体外異物(リガンド)が侵入すると、これを認識した受容体型転写調節因子が細胞質から核内へ移行し、標的遺伝子(酸化酵素、抱合酵素、トランスポーターなど)の発現を誘導して代謝・排泄が促進される。この

ような異物センサーとして機能する細胞内受容体には Arylhydrocarbon Receptor、Steroid and Xenobiotic Receptor や Constitutive Androstane Receptor (CAR)などが知られている。一方で、誘導された代謝酵素は、ステロイドホルモンや甲状腺ホルモンを代謝し内分泌系を攪乱してしまうことも知られている。近年、CARはこのような異

物センサー機能のみでなく、高脂肪食による肥満モデルマウスにおける抗肥満作用や糖尿病モデルマウスでの血糖値の低下に関与することが報告され、注目されている。

2. 研究の目的

CARのアクチベーターであるPBによるCARの活性化に細胞内のエネルギーバランスの変化を感じるセンサーであるAMP依存性プロテインキナーゼ(AMPK)が関与することが報告されている。そこで、ラット初代培養肝細胞を用いAMPK活性化剤であるAICARによるCARの活性化を検討したところ、予想に反し、AICAR処置によりPBによるCARの活性化は抑制された。この現象を詳細に解析したところ、AICARはAMPK非依存的にCARの核移行(言い換えるとCARの活性化)を抑制することが判明した。さらに、ヒトCARにはいくつかのスプライスバリエントが存在することが知られているがその機能は明らかとなっていない。そこで、本研究では、異物受容体として知られるCARの活性調節機構に加え生体外異物に対する薬物代謝酵素の誘導などを介した防御のみでなく、エネルギー代謝に対する作用を検討した。

3. 研究の方法

継代培養細胞株を用いて、分子生物学的手法によりCARの機能の解析を行った。ヒト肝がん由来HepG2細胞にTetリプレッサー(TetR)発現プラスミド及びTetR制御プロモーターを持つヒトCAR発現プラスミドを安定的に導入した細胞株(Hep/TR/CAR細胞)を作成しCARの機能を培養細胞株で評価できる実験系を作成した。転写活性をルシフェラーゼレポーターアッセイにより、遺伝子発現調節をリアルタイムRT-PCR法により評価した。

4. 研究成果

(1) CAR と AMPK の相互作用

ヒトCARのスプライシングバリエントでエクソン7と8の間に12bpが挿入されたCAR-SV2のmRNAの発現量はワイルドタイプCAR-WTとほぼ同程度であることが報告されているが、機能については不明であった。そこで、CAR-SV2を安定的に発現する培養細胞株を作製し、細胞内局在及び転写活性化能を調べたところ、これらゲノミックな変化は観察できなかった。しかし、様々なリガンドで処置し細胞内シグナルを観察したところ、CARのインバースアゴニストとして知られるアンドロスタノールやアンドロステノールにより短時間かつノンゲノミックにエネルギー代謝に関与するAMPKの活性化(リン酸化)が起こることが明らかとなった。

(2) CAR の新規結合タンパク質の同定

CARの新たな機能を明らかにするため、wild type CARとCAR splice variant 2(SV2)をBaitとし免疫共沈降法及びプルダウンアッセイを用いて、新規結合タンパク質の同定を行った。その結果、新たなCAR結合タンパク質として、DEAD(Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 54(DP97)、heat shock protein 60(Hsp60)、Protein Arginine Methyltransferase 5(PRMT5)を同定した。

① DP97

新規CAR結合タンパク質として同定したDP97の機能を検討した。免疫共沈降法によりDP97とCARが結合していることを明らかにした。また、ルシフェラーゼレポーターアッセイによりDP97の過剰発現によりCARによる転写活性化が上昇することが明らかとなった。このことより、DP97はCARのコアクチベーターとして作用することが明らかとなった。さらに、DP97は既知のコアクチベーターであるSRC1やPGC1 α などと相乗的に作用することが明らかとなった。CARをテトラサイクリン依存的に発現するヒト肝がん由来HepG2細胞(Hep/TR/CAR細胞)を用いて、CAR標的遺伝子へのDP97のノックダウンの影響を検討した(図1)。その結果、DP97のノックダウンにより標的遺伝子であるCYP2B6及びUGT1A1 mRNA

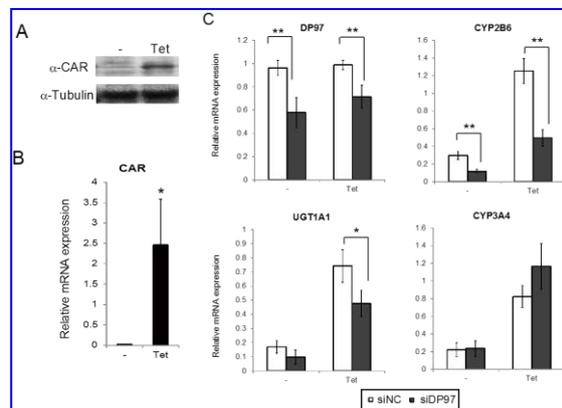


図1 DP97ノックダウンによるCAR標的遺伝子発現への影響

発現の誘導の抑制が認められた。一方、同様にCARの標的遺伝子として知られるCYP3A4の誘導には影響が認められなかった。このことより、DP97はCARのコアクチベーターであること、DP97によるCARを介した遺伝子発現調節には選択性があることが明らかとなった。(Biochem Biophys Res Commun. 2012;426:38-42.)

② PRMT5

新規 CAR 結合タンパク質として同定した PRMT5 の機能を検討した。免疫共沈降法により PRMT5 と CAR が結合していることを明らかとした。また、PRMT5 の過剰発現により CAR による転写活性化が上昇することが明らかとなった。PRMT5 に関するこれまでの報告の多くが転写活性化に対して抑制的に働くものであり、本研究で確認された CAR による転写活性化に対する影響は逆方向であった。また、これらの報告での PRMT5 による転写制御機構の多くは、ヒストンまたは非ヒストンタンパク質のメチル化を介したメチル化活性依存的なものであった。しかしながら、メチル化活性欠損変異体 PRMT5 Δ 5 を用いたレポーターアッセイにおいて wild type と変わらぬ CAR の転写活性化能の亢進効果が認められたことから、PRMT5 は CAR による転写活性化の促進を、メチル化活性非依存的に行っているものと考えられる (図 2)。

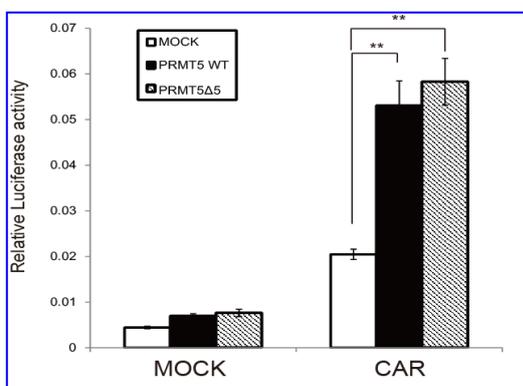


図 2 PRMT5 による CAR 転写活性化能の調節のメチル化活性非依存性

(3) T0901317 による CAR リガンド作用の解明

はじめに、CAR に対するリガンドのスクリーニングを以前に構築したルシフェラーゼアッセイ (若手 (B) 課題番号: 20790114) を用いて行ったところ、T0901317 が CAR のリガンドである可能性が示された。さらに、CAR 応答性のルシフェラーゼレポーター遺伝子発現の T0901317 濃度依存的な抑制が観察された。この結果より、T0901317 は CAR の LBD を介して、濃度依存的に CAR の転写活性化能を抑制するインバーサゴニストであることが示された。さらに、Mammalian two-hybrid 法を用いた検討により、T0901317 は CAR に結合することで、CAR とコアクチベーターとの結合を抑え、CAR とコリプレッサーとの結合を強めるインバーサゴニストであることが示された。

T0901317 は CAR の標的遺伝子転写活性化能に対しどのような影響を与えるかを検討した。HepG2 TR hCAR 細胞を T0901317 およびアゴニストである PK11195 でそれぞれ単独またはテ

トラサイクリンとの併用で処置した。48 時間に RNA を回収し、RT Real-time PCR 法により CYP2B6 の mRNA 発現量を測定した。その結果、CAR によって誘導される CYP2B6 の mRNA の発現量は T0901317 によって減弱することより、T0901317 は CAR の新規なインバーサゴニストであることが判明した。(図 3) (J Toxicol Sci. 2013;38:309-315.)

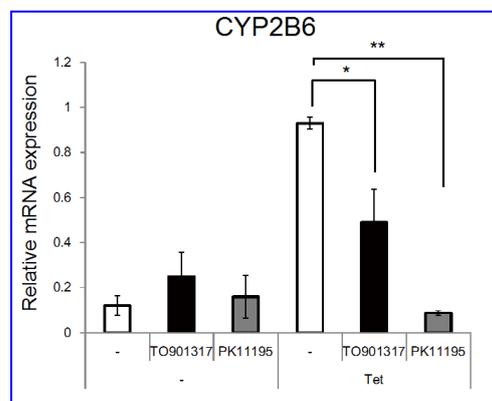


図 3 T0901317 による CAR 依存的 CYP2B6 遺伝子発現誘導の抑制

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- (1) Kanno Y, Tanuma N, Takahashi A, Inouye Y. T0901317, a potent LXR agonist, is an inverse agonist of CAR. J Toxicol Sci. 2013;38(3):309-15. 査読有 doi:10.2131/jts.38.309
- (2) Guo H, Zhao H, Kanno Y, Li W, Mu Y, Kuang X, Inouye Y, Koike K, Jiang H, Bai H. A dihydrochalcone and several homoisoflavonoids from Polygonatum odoratum are activators of adenosine monophosphate-activated protein kinase. Bioorg Med Chem Lett. 2013 Jun 1;23(11):3137-9. 査読有 doi:10.1016/j.bmcl.2013.04.027.
- (3) Zhao S, Ohara S, Kanno Y, Midorikawa Y, Nakayama M, Makimura M, Park Y, Inouye Y. HER2 overexpression-mediated inflammatory signaling enhances mammosphere formation through up-regulation of aryl hydrocarbon receptor transcription. Cancer Lett. 2013 Mar 1;330(1):41-8. 査読有 doi:10.1016/j.canlet.2012.11.021.
- (4) Kanno Y, Serikawa T, Inajima J, Inouye Y. DP97, a DEAD box DNA/RNA helicase, is a target gene-selective

co-regulator of the constitutive androstane receptor. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Sep 14;426(1):38-42. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2012.08.027.

- (5) Zhao S, Kanno Y, Nakayama M, Makimura M, Ohara S, Inouye Y. Activation of the aryl hydrocarbon receptor represses mammosphere formation in MCF-7 cells. Cancer Lett. 2012 Apr 28;317(2):192-8. 査読有 doi: 10.1016/j.canlet.2011.11.025.

〔学会発表〕(計 13 件)

- (1) Masahiko Yoshimi, Interaction between nuclear receptor CAR and Hsp60 日本薬物動態学会 第 27 回年会 東京 2012 年 11 月 22 日
- (2) Yuichiro Kanno, Regulation of nuclear receptor CAR-mediated induction by DP97 日本薬物動態学会 第 27 回年会 東京 2012 年 11 月 22 日
- (3) Jun Inajima, Interaction between nuclear receptor CAR and protein arginine methyltransferase 5. 日本薬物動態学会 第 27 回年会 東京 2012 年 11 月 22 日
- (4) Hidekazu Matsuoka, Establishment of tetracyclin-regulated nuclear receptor CAR expressing HepG2 cells 日本薬物動態学会 第 27 回年会 東京 2012 年 11 月 22 日
- (5) 巨田瑠美, 選択的アンドロゲン受容体調節薬 YK11 による C2C12 細胞筋分化促進機構 第 20 回日本ステロイドホルモン学会 金沢 2012 年 11 月 18 日
- (6) 菅野裕一郎, 新規合成ステロイド化合物 YK11 のアンドロゲン受容体に対する部分アゴニスト活性 第 20 回日本ステロイドホルモン学会 金沢 2012 年 11 月 18 日
- (7) 入内島 潤, 核内受容体 CAR とタンパク質アルギニンメチル化酵素 PRMT の相互作用 フォーラム 2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー(金沢) 2011 年 10 月 28 日
- (8) 吉見 昌彦, 核内受容体 CAR と Hsp60 の相互作用解析フォーラム 2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー 金沢 2011 年 10 月 28 日
- (9) 菅野裕一郎, テトラサイクリン誘導性核内受容体 CAR 発現 HepG2 細胞の樹立と応用 2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー 金沢 2011 年 10 月 28 日
- (10) 田沼 信明, NAD⁺依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 による CAR の転写活性調節機構への影響 2011: 衛生薬学・環境トキ

シコロジー 金沢 2011 年 10 月 28 日

- (11) 菅野裕一郎, 薬物代謝酵素の誘導に関与する CAR の機能と活性調節機構 第 55 回日本薬学会関東支部大会 2011 年 10 月 8 日
- (12) 入内島 潤, 核内受容体 CAR 結合タンパク質の同定 第 55 回日本薬学会関東支部大会 千葉 2011 年 10 月 8 日
- (13) 吉見 昌彦, 核内受容体 CAR による転写活性化における HSP60 の役割 第 55 回日本薬学会関東支部大会 千葉 2011 年 10 月 8 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 裕一郎 (KANNO YUICHIRO)
東邦大学・薬学部・講師
研究者番号: 40453849

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし